Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. R. Schröder

DIE AKTIVITÄT DES LECITHIN-CHOLESTERIN-ACYLTRANSFERASE-SYSTEMS BEI PATIENTEN MIT ÜBER- UND UNTERFUNKTION DER SCHILDDRÜSE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Armbrecht
aus Magdeburg

1975

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
des Klinikums Steglitz der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. R. Schröder

DIE AKTIVITÄT DES LECITHIN-CHOLESTERIN-ACYLTRANSFERASE-SYSTEMS BEI PATIENTEN MIT ÜBER- UND UNTERFUNKTION DER SCHILDDRÜSE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Armbrecht
aus Magdeburg

Referent: Priv. Doz. Dr. F. Adlkofer

Korreferent: Professor Dr. K. Borner

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 1. April 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Methoden:

1. Substanzen und Geräte 4
2. Reinigung der Glaswaren 7
3. Patienten und Diagnostik 7
4. Gewinnung des Plasmas 8
5. Bestimmung der Plasmalipide 8
6. Untersuchung der LCAT-Aktivität durch
   a. Lecithin- und Lysolecithinbestimmung im Plasma 9
   b. Bestimmung der Cholesterinveresterung im Plasma 11
   c. Bestimmung der Cholesterinveresterung in Versuchsansätzen mit konstanter Substratkonzentration 13
7. Proteinbestimmung 14
8. Lipoproteinelektrophorese der Enzym- und Substratfraktion 15

Ergebnisse:

Laborwerte der untersuchten Kollektive 16

Untersuchung des LCAT-Systems:

A. Die inkubationsabhängige Lecithinabnahme und Lysolecithinzunahme im Plasma der untersuchten Kollektive 20

B. Die inkubationsabhängige Cholesterinveresterung im Plasma der untersuchten Kollektive 27

C. Die inkubationsabhängige Cholesterinveresterung in Versuchsansätzen mit konstanter Substratkonzentration 32

Diskussion 38

Zusammenfassung 42

Literaturverzeichnis 43

Die Aktivität des Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Sytems bei Patienten mit Über- und Unterfunktion der Schilddrüse

Bei Patienten mit einer Hypothyreose ist das Cholesterin im Plasma, verglichen mit gesunden Personen, erhöht, während es bei solchen mit einer Hyperthyreose häufig erniedrigt ist oder sich zumindest im unteren Normbereich befindet. Bei beiden Patientengruppen ist das Verhältnis von freiem zu verestertem Cholesterin normal (1,2,3,4).
Trotz des niedrigen Plasmaspiegels ist die Syntheserate des Cholesterins in der Leber bei hyperthyreoten Individuen erhöht (5). Dies ist wahrscheinlich auf eine Aktivierung der bei der Biosynthese des Cholesterins beteiligten ß-Hydroxy-ß-Methyl-Glutaryl-Reduktase durch Schilddrüsenhormone zurückzuführen (6). Das Enzym reduziert ß-Hydroxy-ß-Methyl-Glutarat zu Mevalonsäure, wobei $NADPH_2$ benötigt wird. Die Mevalonsäure ist eine Vorstufe des Cholesterins. Der erniedrigte Cholesterinspiegel bei Patienten mit Hyperthyreose muß folglich, wie auch Untersuchungen an Ratten vermuten lassen, damit zusammenhängen, daß die Ausscheidung von Cholesterin in der Galle erheblich verstärkt ist. Sie ist etwa doppelt so hoch wie bei Normaltieren und fast viermal so hoch wie bei hypothyreoten Tieren. Entsprechend diesen Befunden ist die Halbwertzeit von H_3-Cholesterin bei hyperthyreoten Ratten beträchtlich kürzer als bei hypothyreoten Tieren (5).
Schilddrüsenhormone beeinflussen demnach den Cholesterinspiegel dadurch, daß sie

1. die Biosynthese des Cholesterins in der Leber verstärken und
2. seine Ausscheidung über die Gallenwege beschleunigen.

Dem zweiten Mechanismus kommt offensichtlich die größere Bedeutung zu.

Auch die Proteinbiosynthese wird durch Schilddrüsenhormone beeinflußt, ohne daß dafür bis heute eine zufriedenstellende Erklärung vorliegt. Es ist bekannt, daß schon relativ kleine Dosen von Trijodthyronin in den Leberzellkernen hypothyreoter Ratten 3-4 Stunden nach Verabreichung ein Ansteigen der mRNA-Konzentration hervorzurufen vermögen. Ein Anstieg der rRNA wird nach 24-30 Stunden beobachtet. Nach Ablauf dieser Zeit setzt die Proteinbiosynthese ein (7,8). Möglicherweise ist auch die verstärkte Aktivität der bereits erwähnten ß-Hydroxy-ß-Methyl-Glutaryl-Reduktase auf eine erhöhte Syntheserate des Enzyms zurückzuführen.

Ein weiteres Enzym, das im Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielt, ist die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Sie katalysiert die Übertragung von Fettsäuren, die von der ß-Position des Lecithins abgespalten werden, auf unverestertes Cholesterin. Die Veresterung des Cholesterins erfolgt an der 3-ß-OH-Gruppe (9,10,11,12).
Bei der Reaktion entsteht neben verestertem Cholesterin auch Lysolecithin, welches allerdings in einer nachfolgenden Reaktion durch eine im Plasma vorhandene Lysolecithinase weiter abgebaut wird (13).
Die LCAT scheint in der Leber synthetisiert zu werden. Folgende Beobachtungen sprechen dafür:

1. Bei schweren Leberzellschäden ist die enzymatische Aktivität vermindert (14,15,16). Der Cholesterinestersturz, der bei Lebererkrankungen als prognostisch ungünstiges Zeichen gilt, ist Ausdruck dieser Tatsache.
2. Bei der experimentell an Ratten durch Galaktosamin, Tetrachlorkohlenstoff oder Äthionin ausgelösten Hepatitis sinkt die enzymatische Aktivität im Plasma auf weniger als 10 % der Norm ab (17,18).
3. Nach Eviszeration oder partieller Hepatektomie ist bei Ratten die enzymatische Aktivität im Plasma erniedrigt (19,20).

4. Nach Perfusion der isolierten Rattenleber ist im Perfusat enzymatische Aktivität nachweisbar (21).

Die Isolierung der LCAT ist bisher nicht gelungen. Es ist jedoch möglich, das Enzym durch Fällung mit Ammoniumsulfat und mit chromatographischen Verfahren anzureichern (22,23,24,25). Durch Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte kann es von der α-Lipoproteinfraktion, die ihr Substrat darstellt, getrennt werden (26,27,28,29). Da damit ein beträchtlicher Verlust an enzymatischer Aktivität verbunden ist, liegt die Vermutung nahe, daß ein Komplex aus Enzym und α-Lipoprotein besteht (23,24). Dafür sprechen auch Befunde von Norum und Gjone, die bei Patienten mit genetisch bedingtem Mangel an LCAT bei der elektrophoretischen Auftrennung der Lipoproteine keine α- und prä-β-Banden feststellen konnten (30,31).

Folgende Eigenschaften der LCAT sind bekannt:
Das Molekulargewicht liegt zwischen dem des Albumins (MG = 65.000) und dem des Coeruloplasmins (MG = 160.000) (29). Das pH-Optimum liegt im schwach alkalischen Bereich (23). Calcium-Ionen, p-Hydroxymercuribenzoat sowie Jodacetamid hemmen und Phosphationen aktivieren das Enzym (23). Die reversible Hemmung durch SH-Gruppenblocker weist auf eine erhebliche Bedeutung der SH-Gruppen für den Wirkungsmechanismus hin. Durch zehnminütiges Erhitzen auf 57° C kann das Enzym inaktiviert werden (32).

In der vorliegenden Arbeit soll die Aktivität der LCAT im Plasma hyper- und hypothyreoter Patienten untersucht werden. Es soll festgestellt werden, welche Bedeutung dem Enzym und seinem Substrat bei der Veresterung des Cholesterins zukommt.

1. Substanzen und Geräte

a. Substanzen und ihre Herkunft

Alkohol abs. p.a.	Merck, Darmstadt
Aminonaphtholsulfonsäure p.a.	" "
Ammoniumheptamolybdat p.a.	" "
Barbital-Natrium p.a.	" "
Brom p.a.	" "
^{14}C-Cholesterin in Benzol, spezifische Aktivität: 57 mCi/mMol	New England Nuclear, Boston/Mass.
Diäthyläther p.a.	Merck, Darmstadt
Dimethyl-POPOP für Szintillationsmessungen	" "
Dinatriumphenylphosphat p.a.	" "
Dioxan für Szintillationsmessungen	" "
Dünnschichtchromatographie-platten, Kieselgel F 254	" "
Eisessig p.a.	" "
Essigsäure 5 %	eigene Verdünnung
Essigsäureanhydrid p.a.	Merck, Darmstadt
Humanalbumin 20 %	Behringwerke, Marburg
Jod, doppelt sublimiert p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumbromid p.a.	" "
Kochsalztabletten à 9 g	" "
Kupfer(2)sulfat-5-hydrat p.a.	" "
Methanol p.a.	" "
Mercaptoäthanol p.a.	" "
Naphtalin für Szintillations-messungen	" "

Natronlauge 10 % p.a.	Merck, Darmstadt
Natronlauge 0,1 n p.a.	" "
Natriumbicarbonat p.a.	" "
Natriumcitrat 3,8 %	Fresenius KG, Bad Homburg
Natriumhyposulfit p.a.	Merck, Darmstadt
di-Natriumtartrat p.a.	" "
Ölrot-O	Chroma-Gesellschaft Schmidt+Co, Stuttgart-Untertürckheim
p-Hydroxymercuribenzoat	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure 70 % p.a.	" "
Petroleumbenzin p.a.	" "
Phenolreagenz nach Folin Ciocalteu	" "
PPO (2,5-Diphenyloxazol) für Szintillationsmessungen	" "
Salzsäure 1n p.a.	" "
"Tetrasorb 125"	Deutsche Abott G.m.b.H., Ingelheim
"Thyopac -3"	Radiochemical Center, Amersham, England
Zelluloseacetatstreifen Sephaphore III	Gelman Instrument Comp., Ann Arbor/Mich.
"Biochemica Test Combinationen"	Boehringer, Mannheim
1. "Phosphor und Phosphatide"	
2. "Cholesterin"	
3. "Verestertes Cholesterin"	
4. "Neutralfett (Triglyceride) und Glycerin"	

b. Geräte und ihre Herkunft

Alu-Thermo-Block	Liebisch, Brackwede
Chromatographiekammer	Desaga, Heidelberg
Elektrophoresegerät U77 Typ III	Shandon, Frankfurt a.M.
Gefriertrockner	Leybold, Köln
Membranfilter (Kollodium-hülsen SM 13.200)	Sartorius, Göttingen
Mikrometerspritze "Hamilton"	Micromesure N.V., Den Haag
Packard Tri-carb Röhrchen	Packard Instr. G.m.b.H., Frankfurt a.M.
pH - Meter	Knick, Berlin
Photometer Eppendorf	Netheler + Hinz, Hamburg
Rotationsverdampfer Rotavapor "R"	Büchi, Flavil/Schweiz
Rückflußkühler NS 29	" "
Spektralphotometer DK 2A	Beckman, München
stabilisierendes Spannungs gerät Vokam 2541	Shandon, Frankfurt a.M.
stabilisierendes Spannungs-gerät Vokam 2761	" "
Szintillationszähler Packard Tri-carb	Packard Instr. G.m.b.H., Frankfurt a.M.
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Beckman, München
Vakuumfiltrationsgerät	Eigenbau
Zellulosenitrat Röhrchen	Beckman, München
Zentrifuge	Stock, Marburg

2. Reinigung der Glaswaren

Alle Glaswaren wurden mit handelsüblichem Spülmittel gereinigt. Glasgeräte, die für die Phosphatbestimmung benutzt wurden, verblieben nach dieser Reinigung zusätzlich 24 Stunden in Chromschwefelsäure. Anschließend wurden sie 24 Stunden in fließendem Wasser gewässert, mit Aqua destillata nachgespült und im Wärmeschrank getrocknet.

3. Patienten und Diagnostik

Untersucht wurden 7 Patienten mit Hyperthyreose (20 - 69 Jahre), 5 Patienten mit Hypothyreose (20 - 70 Jahre) und 5 gesunde Personen (23 - 38 Jahre). Als Vergleichskollektiv wurden 10 Patienten mit Leberzirrhose (40 - 67 Jahre) verwendet.
Bei allen Patienten mit einer Schilddrüsenfunktionsstörung wurde der Radiojodtest durchgeführt. Bei den Patienten mit Hyperthyreose wurde der Suppressionstest mit Trijodthyronin und bei denen mit einer Hypothyreose der Stimulationstest mit Thyreostimulin angeschlossen. Weiter wurde im Serum das proteingebundene Jod (PBJ) und das Gesamtthyroxin (Tetrasorb 125) bestimmt und der T_3-in vitro Aufnahme-Test (Hamolsky-Test)(Thyopac -3) durchgeführt. Aus der Thyroxinkonzentration und den Ergebnissen des Hamolsky-Testes wurde der "Freies Thyroxin Index" berechnet. Bei den Patienten mit einer Lebercirrhose, die durch Laparoskopie gesichert worden war, wurden zusätzlich im Rahmen der klinischen Routinediagnostik die Serumkonzentration des Gesamtproteins, der prozentuelle Anteil des Albumins und des γ-Globulins, die Aktivität der Transaminasen (SGOT, SGPT) und der alkalischen Phosphatase und der Gerinnungswert (Quick) bestimmt.

4. Gewinnung des Plasmas

Blutabnahmen wurden 12 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme durchgeführt. Als Antikoagulanz wurde 3,8 %-ige Natriumcitratlösung (v/v=1:4) benutzt. Die Zentrifugation erfolgte unmittelbar nach der Blutgewinnung während 10 Minuten bei 2.500 Upm. Das Plasma wurde sofort weiterverarbeitet.

5. Bestimmung der Plasmalipide

Die Lipide wurden mit den Biochemica Test Combinationen der Firma Boehringer, Mannheim, bestimmt. Im folgenden ist lediglich das Prinzip der Bestimmungsmethoden wiedergegeben.

a. Gesamtcholesterin:

Aus Cholesterin und Dimethylbenzolsulfonsäure in konzentrierter essigsaurer Lösung wird bei Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure ein Farbstoff gebildet, dessen Konzentration dem Cholesteringehalt proportional ist (33,34).

b. Freies Cholesterin:

Das freie Cholesterin wird mit Isopropylalkohol, Digitoninlösung und Aceton isoliert und anschließend wie das Gesamtcholesterin bestimmt (33,35,36,37).

c. Phosphatide:

Phosphatide werden zusammen mit den Serumproteinen gefällt. Der Niederschlag wird bei 180 - 200° C verascht. In saurer Lösung bildet Phosphor mit Ammoniummolybdat und Ammoniumvanadat einen Farbkomplex, dessen Intensität dem Phosphatidgehalt proportional ist (38).

d. Neutralfett:

Die Neutralfette werden verseift. Das freigesetzte Glycerin wird unter Verwendung von $NADH_2$ reduziert. Gemessen wird die während der Reaktion verbrauchte $NADH_2$-Menge, die der Menge an Glycerin äquivalent ist. Der Plasmagehalt an freiem Glycerin wird bei dieser Methode vernachlässigt (39).

6. Bestimmung der LCAT-Aktivität im Plasma

Die LCAT-Aktivität im Plasma wurde bestimmt, indem die Lecithinabnahme, die Lysolecithin- und die Cholesterinesterzunahme während einer 23-stündigen Inkubation bei einer Temperatur von 37° C gemessen wurden. Drei verschiedene Verfahren wurden angewendet:

a. Im ersten Verfahren wurde Plasma 2, 8 und 23 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden in den einzelnen Proben die Lecithinabnahme und zusätzlich die Lysolecithinzunahme in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt (41,42,43,44,45,46).

Prinzip:
Die Lipide werden extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Lecithin und Lysolecithin werden verascht, so daß ihr Phosphorgehalt photometrisch bestimmt werden kann.

Extraktion:
Proben von je 1 ml Citratplasma wurden unmittelbar nach der Gewinnung (0-Stundenwert) und nach 2-, 8- und 23-stündiger Inkubation lyophilisiert. Anschließend wurde die Trockensubstanz in 1 ml Methanol aufgeschwemmt und 10 Minuten in einem Wasserbad von 37° C gehalten. Nach Zugabe von Chloroform und nochmaliger Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde das Extraktionsgemisch bei 3.000 Upm 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in Schliff-

zentrifugenröhrchen dekantiert, der Niederschlag mit 1,5 ml eines Methanol-Chloroform-Gemisches (v/v=1:2) nachgewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und mit dem Rotationsverdampfer eingeengt. Die extrahierten Lipide wurden in 1 ml eines Gemisches aus Chloroform und Petroläther (v/v=1:1) aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie:
0,1 ml (bei Patienten mit Hypothyreose nur 0,05 ml) der Lipidlösung wurden mit einer Hamilton-Mikrometer-Spritze auf Dünnschichtplatten aufgetragen, die vorher bei 100° C aktiviert worden waren. Die Auftrennung der Lipide erfolgte mit einem Laufmittel aus Chloroform, Methanol und Wasser im Verhältnis 65:25:3 über einen Zeitraum von 100 Minuten. Die lecithin- und lysolecithinhaltigen Banden wurden nach Anfärbung mit Joddampf entsprechend ihrem RF-Wert bestimmt.

Phosphorbestimmung:
Die lecithin- und lysolecithinhaltigen Zonen wurden in 0,1 ml einer 70 %-igen Perchlorsäurelösung aufgenommen und im Aluminiumblock auf 180° C während 30 Minuten erhitzt. Nach Abkühlung wurden 4,6 ml einer 0,22 %-igen Ammoniummolybdatlösung und anschließend 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz zugegeben. Nach der Farbentwicklungsreaktion bei 100° C während 10 Minuten wurde das Kieselgel durch Zentrifugation entfernt. Die Extinktion im Überstand wurde bei 660 nm gegen einen phosphatfreien Leerwert gemessen. Diese wurde mit der einer Eichlösung verglichen, die im gleichen Volumen 2 µg Phosphor (16,407 µg Dinatriumphenylphosphat/0,5 ml H_2O) enthielt.
Die Berechnung des Phosphorgehaltes erfolgte nach folgender Formel:

$$P_x = \frac{E_x \cdot P_e}{E_e}$$

Hierbei bedeuten: P_p = Phosphorgehalt der Probe,

E_p = Extinktion der Probe,

P_e = Phosphorgehalt der Eichlösung,

E_e = Extinktion der Eichlösung.

Der Phosphorgehalt des Lecithins (MG = 792) wurde mit 3,9 % und der des Lysolecithins (MG = 520) mit 5 % angenommen.

Herstellung des Fiske-Subbarow-Reagenz:
6,5 g Natriumhyposulfit ($NaHSO_3$) und 0,125 g Aminonaphtholsulfonsäure wurden in 50 ml Aqua tridest. gelöst. Danach wurde 30 %-ige Natriumsulfitlösung zugefügt, bis die Trübung verschwand. Das Reagenz wurde im Dunkeln aufbewahrt und höchstens 14 Tage verwendet.

b. Im zweiten Verfahren wurde Plasma nach Zugabe von ^{14}C-markiertem Cholesterin 2, 8 und 23 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde in den einzelnen Proben die Veresterung von ^{14}C-Cholesterin in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt (23,47).

Prinzip:
Die Lipide werden extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Aus dem Verhältnis unverestertes/verestertes ^{14}C-Cholesterin kann bei bekannter Konzentration des freien Cholesterins die Veresterung berechnet werden. Als Voraussetzung wird angenommen, daß sich das zugesetzte Cholesterin wie das endogene Cholesterin verhält.

Inkubationsansätze:
Sie enthielten 4 ml Plasma und 1 ml ^{14}C-Cholesterin-Albumin-Suspension (0,5 µCi). Proben von je 0,5 ml wurden sofort nach der Herstellung der Ansätze (0 Stunden) sowie nach 2-, 8- und 23-stündiger Inkubation bei 37° C lyophilisiert.

Extraktion:
Sie erfolgte wie in Methode 6a.

Dünnschichtchromatographie:
Die Dünnschichtchromatographie wurde ebenfalls wie in Methode 6a durchgeführt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Petroläther, Diäthyläther und Eisessig im Verhältnis 74:25:1 verwendet. Die Laufzeit betrug 40 Minuten. Die Zonen mit dem veresterten und dem unveresterten Cholesterin wurden nach Anfärben mit Joddampf entsprechend ihrem RF-Wert ermittelt.

Szintillationsmessung:
Die cholesterinhaltigen Zonen wurden in 3 ml absolutem Alkohol aufgenommen und 30 Minuten bei 50° C extrahiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 3.000 Upm wurde der Überstand in Packard-Tri-carb-Röhrchen dekantiert. Der Unterstand wurde mit 1,5 ml absolutem Alkohol nachgewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls in die Tri-carb-Röhrchen gegeben, die mit 10 ml einer Szintillationslösung aufgefüllt wurden. Diese enthielt in 1 l Dioxan 120 g Naphthalin, 4 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,05 g 2,2 -p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyloxazol)(POPOP). Die Radioaktivität wurde im Packard-Liquid-Szintillation-Counter gemessen.

Herstellung des albumingebundenen ^{14}C-Cholesterins:
50 µCi ^{14}C-Cholesterin in Benzol wurden am Rotationsverdampfer getrocknet und in 10 ml absolutem Alkohol aufgenommen. Diese Lösung wurde bei -20° C aufbewahrt. Bei Bedarf wurden von diesem Vorrat unter ständigem Rühren je 3 ml (15 µCi ^{14}C-Cholesterin) zu je 28 ml 5 %-iger Humanalbumin-Lösung gegeben, die zuvor 20 Minuten auf 57° C erhitzt worden war. Das Äthanol wurde anschließend mit Hilfe von Stickstoff entfernt. Nun wurde die Suspension mit 5 %-iger Humanalbumin-Lösung auf 30 ml aufgefüllt, in mehrere Einzelportionen aufgeteilt und bei -20° C aufbewahrt. Die Haltbarkeit betrug 3 Monate.

Berechnung der Cholesterinveresterung:
Die Berechnung der Cholesterinveresterung erfolgte nach folgender Formel:

$$CE = \frac{C \cdot C_A E}{C_A}$$

Es bedeuten:

CE = Cholesterinesterbildung während der Inkubation in µMol/l,

C = Konzentration des unveresterten Cholesterins vor der Inkubation in µMol/l,

$C_A E$ = Veresterung von ^{14}C-Cholesterin während der Inkubation in CPM,

C_A = Eingesetztes unverestertes ^{14}C-Cholesterin in CPM.

c. Im dritten Verfahren wurden aus dem Plasma die Lipoproteine durch Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte entfernt und durch ein Lipoproteinpräparat ersetzt, das ^{14}C-Cholesterin enthielt. Die so erhaltenen Proben wurden 23 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Veresterung von ^{14}C-Cholesterin bestimmt (17,29).

Prinzip:
Wie unter 6b.

Gewinnung der lipidfreien Plasmafraktion (Enzymfraktion):
Plasma wurde mit Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,21 g/ml gebracht (29,285 g KBr/100 ml) und im Rotor 40 während 24 Stunden bei 4° C mit 40.000 Upm zentrifugiert. Der Röhrcheninhalt wurde bis auf 3 ml Unterstand, der nur noch wenig Lipide enthielt, verworfen. Die so erhaltene Plasmafraktion wurde gegen eine Außenphase, die aus einer mit Natriumbicarbonat gepufferten physiologischen Kochsalzlösung bestand, 24 Stunden bei 4° C dialysiert. Vor Verwendung wurde der Gehalt an freiem Cholesterin, Lecithin und Protein bestimmt.

Gewinnung der Lipoproteinfraktion (Substratfraktion):
Plasma aus einer Blutkonserve wurde 30 Minuten bei 60° C inaktiviert und mit Kaliumbromid auf die Dichte von 1,21 g/ml gebracht. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 4° C im Rotor 40 während 24 Stunden. Der Röhrcheninhalt

wurde bis auf 4 ml Überstand, der die Lipoproteinfraktion enthielt, verworfen. Die lipoproteinhaltige Fraktion aus allen Röhrchen wurde vereinigt und 24 Stunden bei 4° C gegen mit Bicarbonat gepufferte physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Nach der Bestimmung des freien Cholesterins und des Lecithins wurde die "Substratfraktion" in kleine Portionen aufgeteilt und bei -20° C aufbewahrt.

Inkubationsansätze:
Sie enthielten 2,5 ml Enzymfraktion, 0,5 ml Substratfraktion und 0,5 ml ^{14}C-Cholesterin-Albumin-Suspension. Proben von jeweils 1 ml wurden sofort nach der Herstellung des Ansatzes (0 Stunden) und nach 23-stündiger Inkubation entnommen und wie unter 6b angegeben verarbeitet.

7. Proteinbestimmung (48)

Folgende Lösungen wurden verwendet:

A. 2 %-ige Na_2CO_3 in 100 ml 0,1 n NaOH,

B. 1 %-ige $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$,

C. 2 %-ige Natriumtartratlösung,

D. Folin-Ciocalteu-Reagenz.

Durchführung: 50 ml der Lösung A wurden mit 0,5 ml der Lösung B sowie weiteren 0,5 ml der Lösung C vermischt. Zu 5 ml dieser Lösung wurden 1 ml der verdünnten Proteinlösung und nach Ablauf von 10 Minuten 0,5 ml mit Aqua bidest. 2:1 (v/v) verdünntes Folin-Ciocalteu-Reagenz gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer mit Humanalbumin erhaltenen Eichkurve bestimmt.

8. Lipoproteinelektrophorese der Enzym- und Substratfraktion (49,50)

Folgende Lösungen wurden hergestellt:
A. Ölrot-O-Lösung: Unter Rühren wurden 0,4 g Ölrot-O in 700 ml Methanol gelöst, mit Aqua tridest. auf 1.000 ml aufgefüllt und danach am Rückflußkühler im Wasserbad kurz aufgekocht.
B. Entfärbelösung: 5 ml Brom wurden in 100 ml 10 %-iger NaOH gelöst. 10 ml dieser Hypobromitlösung wurden mit etwa 100 ml 5 %-iger Essigsäure gemischt.
C. Transparenzlösung: 22,5 ml Essigsäureanhydrid wurden mit Methanol auf 175 ml aufgefüllt.

Durchführung: Zelluloseacetatstreifen wurden mit Veronalpuffer (pH 8,6) getränkt und auf Filterpapier leicht getrochnet. 5,5 cm vom Kathodenende wurden mit dem Applikator einige Mikroliter der Fraktion aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte während eines Zeitraumes von 2 Stunden bei einer konstanten Spannung von 150 Volt. Anschließend wurden die Streifen 12 Stunden mit Ölrot-O-Lösung angefärbt. Nachdem sie im Entfärbebad eine Minute gebleicht und 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült worden waren, wurden sie auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Danach wurden sie kurz ins Transparenzbad getaucht und auf saubere Objektträger gebracht.

Ergebnisse

Im folgenden wurde bei hyper- und hypothyreoten Patienten die Aktivität der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase untersucht und mit der bei gesunden Personen und Patienten mit Leberzirrhose verglichen. Bei letzteren ist sie, wie aus der Literatur bekannt ist (14,15,16), erniedrigt. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität, deren Folge die Umwandlung von Lecithin zu Lysolecithin und die Übertragung der abgespaltenen Fettsäuren auf Cholesterin ist, wurden drei verschiedene Verfahren verwendet. In Abhängigkeit von der Zeit wurde beim ersten der Lecithinabbau und die Lysolecithinzunahme im Plasma, beim zweiten die Cholesterinveresterung im Plasma und beim dritten die Cholesterinveresterung bei konstanter Substratkonzentration bestimmt. Bei allen Patienten mit einer Schilddrüsenfunktionsstörung wurde diese wie beschrieben durch nuklearmedizinische Funktionsteste (Methode 3) bestätigt. Die dabei erhaltenen Befunde wurden durch weitere laborchemische Untersuchungen gesichert (Tab. 1a und b).

Tab. 1a-c: Laborbefunde bei Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen, ermittelt in der nuklearmedizinischen Abteilung im Klinikum Steglitz, dazu die Normalbereiche.

a. Hyperthyreosen:

Pat.	Alter	Geschl.	PBI µg/l	Hamolsky-Test	Thyroxin im Serum µg/l	"Freies Thyroxin Index"
H.S.	30 J.	w.	144	0,73	250	343
C.K.	33 J.	w.	159	0,82	198	241
A.S.	20 J.	w.	106	0,76	138	182
D.K.	34 J.	m.	168	0,57	250	439
U.S.	50 J.	w.	131	0,78	198	254
K.W.	28 J.	m.	-	0,68	200	294
E.C.	69 J.	m.	-	0,81	209	258

b. Hypothyreosen:

Pat.	Alter	Geschl.	PBI µg/l	Hamolsky-Test	Thyroxin im Serum µg/l	"Freies Thyroxin Index"
E.B.	34 J.	w.	25	1,45	31	21
E.L.	41 J.	m.	14	1,16	38	33
J.G.	20 J.	w.	-	1,33	19	14
E.S.	32 J.	w.	26	1,18	41	35
E.V.	70 J.	w.	10	1,28	9	7

c. Normalwerte:

PBI µg/l	Hamolsky-Test	Thyroxin im Serum µg/l	"Freies Thyroxin Index"
40 - 80	0,92 - 1,22	50 - 145	45 - 150

Wie zu erwarten, waren bei den Patienten mit einer Schilddrüsenfunktionsstörung auch die Plasmalipidkonzentrationen im Vergleich zu Kontrollwerten, die bei Normalpersonen erhalten wurden, stark verändert (Tab. 2a-c). Bei den hyperthyreoten Patienten waren die Triglyceride (TG), das Gesamtcholesterin (TC) und das freie Cholesterin (FC) sowie die Phosphatide (P) einschließlich Lecithin (L) erniedrigt und bei den hypothyreoten Patienten erhöht. Das Verhältnis von freiem Cholesterin zum Gesamtcholesterin war normal.

Tab. 2a-c: Konzentration der Triglyceride (TG), des gesamten (TC) und des freien Cholesterins (FC), der Phosphatide (P) und des Lecithins (L) bei gesunden Personen und Patienten mit Hyper- und Hypothyreose. Konzentrationen in mg/100 ml mit Mittelwerten und Standardabweichungen.

a. Normalkollektiv:

Pat.	Alter	Geschl.	TG	TC	FC	P	L
D.B.	28 J.	m.	94,4	161,6	44	112,0	78,7
H.L.	23 J.	w.	104,0	175,2	38	190,4	115,4
H.S.	38 J.	m.	126,4	131,8	35	179,2	107,6
A.S.	36 J.	m.	74,4	130,6	36	140,0	84,0
L.U.	29 J.	m.	79,2	123,2	47	153,6	87,6
	$m \pm s$		95,7 ±20,9	144,5 ±22,6	40,0 ±5,2	155,0 ±31,3	94,7 ±15,9

b. Hyperthyreosen:

Pat.	Alter	Geschl.	TG	TC	FC	P	L
H.S.	30 J.	w.	65,4	105,6	31	156,8	96
C.K.	33 J.	w.	95,2	75,2	24	120,8	78
A.S.	20 J.	w.	107,2	110,2	34	124,0	75
D.K.	34 J.	m.	49,3	105,6	30	150,4	85
U.S.	50 J.	w.	83,7	124,0	23	162,4	98
K.W.	28 J.	m.	67,6	95,2	29	92,8	57
E.C.	69 J.	m.	47,0	108,0	32	142,4	87
	$m \pm s$		73,6 ±22,7	103,4 ±15,3	29,0 ±4,1	135,7 ±24,6	82,3 ±14,0

c. Hypothyreosen:

Pat.	Alter	Geschl.	TG	TC	FC	P	L
E.B.	34 J.	w.	127,3	417,9	125	358,9	185
E.L.	41 J.	m.	120,4	356,5	110	331,7	195
J.G.	20 J.	w.	160,8	311,2	94	344,8	202
E.S.	32 J.	w.	90,4	242,4	97	264,0	153
E.V.	70 J.	w.	142,2	292,3	59	291,8	186
	$m \pm s$		128,2 ±26,2	324,1 ±66,5	97,0 ±24,5	318,2 ±39,3	184,2 ±18,8

Tab. 3: Laborbefunde bei Patienten mit Leberzirrhose, ermittelt im klinischen Zentrallabor im Klinikum Steglitz. Dazu sind die Normalwerte mit oberem und unterem Schwankungsbereich angegeben.

Pat.	Alter	Geschl.	Gesamt-protein g/l	Albumin % [1]	γ-Globulin % [1]	Quick % [2]	SGOT [3] IE/l	SGPT [4] IE/l	alkalische Phosphatase IE/l
H.E.	57 J.	m.	66,3	27	3o	78	24	21	145
E.S.	67 J.	m.	88,0	31	36	54	16	15	11o
G.G.	48 J.	m.	73,4	28	35	33	28	26	210
W.S.	40 J.	m.	69,3	23	27	49	29	5	213
E.G.	56 J.	w.	65,0	29	29	83	31	17	245
W.D.	62 J.	m.	71,4	33	21	58	10	8	158
T.H.	63 J.	m.	58,0	30	18	60	11	6	500
I.M.	67 J.	w.	66,1	29	19	64	14	9	184
H.G.	53 J.	w.	67,2	31	25	63	22	1o	127
E.S.	58 J.	w.	62,8	28	20	55	58	50	454

1) in Prozent des Gesamtproteins

2) in Normprozenten

3) Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase

4) Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Normalwerte:

Gesamtprotein	(g/l)	: 65,6 - 75,8 - 86,5
Albumin	(% [1])	: 52,6 - 61,7 - 69,9
γ-Globulin	(% [1])	: 9,8 - 14,6 - 19,9
Quick	(% [2])	: 70 - 100
SGOT [3]	(IE/l)	: 3,6 - 8,6 - 21,0
SGPT [4]	(IE/l)	: 0 - 5,8 - 20,7
alk. Phosphatase	(IE/l)	: 52 - 95 - 169

Bei Patienten mit einer Leberzirrhose, die durch Laparoskopie und Biopsie gesichert war, wurden die in Tabelle 3 aufgeführten laborchemischen Befunde erhoben. Sie sind entsprechend der Grunderkrankung mehr oder weniger stark pathologisch verändert.

A. Lecithinabnahme und Lysolecithinzunahme im Plasma von gesunden Personen und Patienten mit Hyper- und Hypothyreose in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Methode 6a)

Aus Plasma, das verschieden lang bei 37° C inkubiert worden war, wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Abbildung 1 zeigt ein Chromatogramm, auf dem die verschieden stark angefärbten Lecithin- und Lysolecithinbanden bereits auf eine inkubationsabhängige Abnahme des Lecithins und auf eine Zunahme des Lysolecithins schließen lassen. Diese Beobachtung wurde bei der quantitativen Auswertung bestätigt.

Abb. 1: Dünnschichtchromatographie des Lipidextraktes aus Humanplasma.
Laufmittel: Chloroform, Methanol, Wasser im Verhältnis 65:25:3, Laufzeit: 100 Minuten.

a. Extraktionsgemisch aus nicht inkubiertem Plasma (0 Stunden),

b. Extraktionsgemisch aus 23 Stunden bei 37° C inkubiertem Plasma.

L = Lecithin,
LL = Lysolecithin,
A = Auftragstelle.

Die Lipidbestimmung, deren Ergebnis in Tabelle 4 und Abbildung 2 dargestellt ist, zeigt, daß bei hyperthyreoten Patienten wesentlich weniger Lecithin abgebaut wird als bei hypothyreoten. Verglichen mit dem Normalkollektiv ist der Lecithinabbau bei den Patienten mit einer Hyperthyreose erniedrigt und bei denen mit einer Hypothyreose erhöht.

Tab. 4a-c: Abbau von Lecithin im Plasma von Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während 23 Stunden bei 37° C (Mittelwerte ± Standardabweichungen). Angegeben ist jeweils die Plasmakonzentration in µMol/l.

a. Normalkollektiv:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
D.B.	997	906	845	810
H.L.	1452	1367	1224	1081
H.S.	1364	1240	1246	1009
A.S.	1061	1027	903	837
L.U.	1111	1012	955	885
$m \pm s$	1197 ±199	1110 ±118	1035 ±187	924 ±116

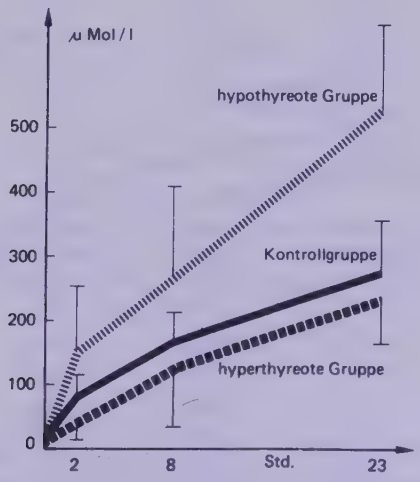
b. Hyperthyreosen:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
H.S.	1212	1172	1117	888
C.K.	985	-	901	708
A.S.	947	826	858	777
D.K.	1073	989	980	878
U.S.	1257	1180	933	924
K.M.	720	712	638	551
E.C.	1093	1059	-	895
$m \pm s$	1039 ±176	990 ±139	905 ±158	803 ±135

c. Hypothyreosen:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
E.B.	2336	2193	2019	1812
E.L.	2462	2356	2217	1828
J.G.	2551	2527	2437	2037
E.S.	1932	1655	1448	1313
E.V.	2348	2163	2187	2012
$m \pm s$	2336 ±237	2179 ±327	2062 ±374	1800 ±291

Abb. 2: Lecithinabbau bei 37° C im Plasma von Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während einer 23-stündigen Inkubation. Die Werte nach 2, 8 und 23 Stunden sind mit ihren Standardabweichungen angegeben.



Diesem Befund entspricht die inkubationsabhängige Zunahme des Lysolecithins. Auch sie ist bei den hyperthyreoten Patienten geringer als bei den hypothyreoten. Verglichen mit dem Normalkollektiv ist sie bei den hyperthyreoten Patienten erniedrigt und bei den hypothyreoten erhöht (Tab. 5, Abb. 3). Insgesamt erreicht die molare Lysolecithinzunahme kaum mehr als 60 % der molaren Lecithinabnahme.

Tab. 5a-c: Entstehung von Lysolecithin im Plasma von Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während 23 Stunden bei 37° C (Mittelwerte ± Standardabweichungen). Die Plasmakonzentrationen sind in µMol/l angegeben.

a. Normalkollektiv:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
D.B.	235	296	348	418
H.L.	134	170	286	394
H.S.	160	178	309	381
A.S.	232	253	328	409
L.U.	196	266	357	406
m±s	191 ±44	233 ±56	326 ±29	402 ±14

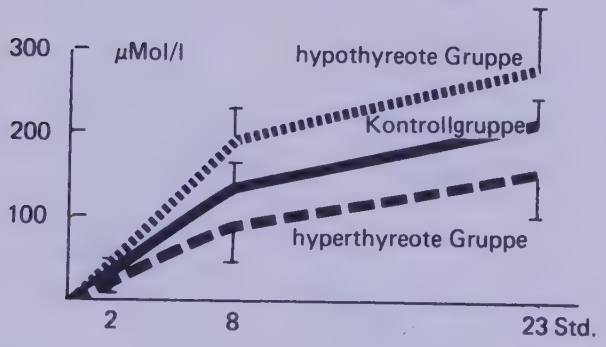
b. Hyperthyreosen:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
H.S.	191	208	260	312
C.K.	242	262	335	348
A.S.	112	159	288	332
D.K.	200	205	243	317
U.S.	173	205	-	335
K.W.	170	202	251	306
E.C.	165	230	248	267
m±s	179 ±39	210 ±31	271 ±35	317 ±26

c. Hypothyreosen:

Patient	0 Stunden	2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
E.B.	254	301	445	534
E.L.	186	243	437	551
J.G.	226	252	436	562
E.S.	252	302	403	461
E.V.	344	396	499	554
$m \pm s$	252 ±58	299 ±61	444 ±35	532 ±41

Abb. 3: Entstehung von Lysolecithin im Plasma von Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während einer 23-stündigen Inkubation bei 37° C. Die Mittelwerte nach 2, 8 und 23 Stunden sind jeweils mit Standardabweichungen angegeben.



Es fällt dabei auf, daß zwischen dem Lecithinabbau und der Lecithinkonzentration des untersuchten Plasmas eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0{,}001$) besteht, d.h.

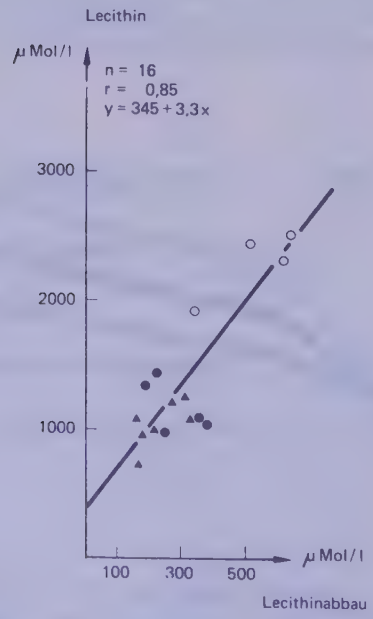
bei erhöhter Lecithinkonzentration ist der Umsatz verstärkt und bei erniedrigter verringert (Abb. 4). Diesem Befund entsprechend ist der Lecithinabbau, angegeben in Prozent der Ausgangskonzentration, bei allen drei Kollektiven während der 23-stündigen Inkubation etwa gleich groß. Er beträgt 22 - 23 %.

Abb. 4: Korrelation zwischen der Lecithinkonzentration im Plasma und dem Lecithinabbau nach 23-stündiger Inkubation bei 37° C. Berücksichtigt wurden alle drei untersuchten Kollektive.

● = Normalpersonen,

▲ = Patienten mit Hyperthyreose,

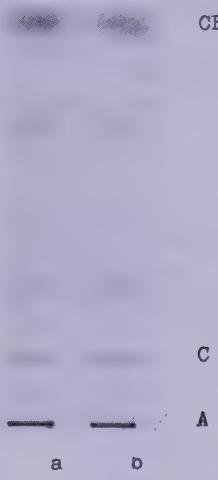
○ = Patienten mit Hypothyreose.



B. Cholesterinveresterung im Plasma von gesunden Personen und Patienten mit Hyper- und Hypothyreose in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Methode 6b)

Aus verschieden lang inkubiertem Plasma, dem vor der Inkubation ^{14}C-Cholesterin zugesetzt worden war, wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die inkubationsabhängige Cholesterinveresterung wurde unter Verwendung des ^{14}C-Cholesterins bestimmt.

Abb. 5: Dünnschichtchromatographie des Lipidextraktes aus Inkubationsansätzen. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Petroläther, Diäthyläther und Eisessig im Verhältnis 74:25:1 verwendet. Die Entwicklungszeit betrug 40 Minuten.



a. vor Inkubation (0 Stunden),

b. nach 23-stündiger Inkubation.

CE = Cholesterinester,
C = freies Cholesterin,
A = Auftragstelle.

Die Cholesterinveresterung war bei den hyperthyreoten Patienten im Vergleich zum Normalkollektiv etwas erniedrigt und bei den hypothyreoten stark erhöht (Tab. 6, Abb. 6).

Tab. 6a-c: Veresterung von Cholesterin im Plasma von Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während 23 Stunden bei 37° C. Die Ausgangskonzentration des freien Cholesterins (FC) wurde dem Lipidstatus (Tab. 2a-c) entnommen und in µMol/l umgerechnet (Mittelwerte ± Standardabweichungen).

a. Normalkollektiv:

Patient	FC	Veresterung nach		
		2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
D.B.	1140	32	144	355
H.L.	984	31	117	318
H.S.	907	30	114	239
A.S.	933	34	112	261
L.U.	1218	52	161	315
m±s	1036 ±136	36 ±9	130 ±22	298 ±47

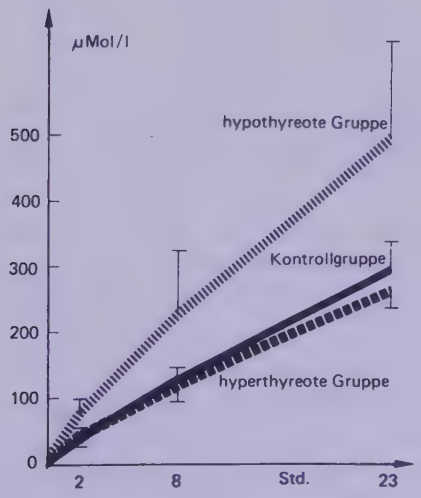
b. Hyperthyreosen:

Patient	FC	Veresterung nach		
		2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
H.S.	803	55	95	237
C.K.	622	21	68	174
A.S.	881	64	131	301
D.K.	777	36	118	255
U.S.	596	35	97	211
K.W.	751	42	143	256
E.C.	829	47	113	281
m±s	751 ±106	43 ±14	109 ±25	245 ±43

c. Hypothyreosen:

Patient	FC	Veresterung nach 2 Stunden	8 Stunden	23 Stunden
E.B.	3238	100	298	655
E.L.	2850	109	286	623
J.G.	2435	71	216	511
E.S.	2513	71	232	505
E.V.	1528	46	129	275
$m \pm s$	2513 ±636	79 ±25	232 ±67	514 ±149

Abb. 6: Veresterung von Cholesterin bei Normalpersonen sowie Patienten mit Hyper- und Hypothyreose während einer 23-stündigen Inkubation bei 37° C. Die Werte nach 2, 8 und 23 Stunden sind jeweils mit ihren Standardabweichungen angegeben.



Diese Befunde stimmen mit denen überein, die bei der Bestimmung des Lecithinabbaus und der Lysolecithinzunahme erhalten wurden. Auch zwischen der Cholesterinveresterung und der Konzentration des freien Cholesterins im Plasma besteht eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0{,}001$), d.h. es wird umso mehr Cholesterin verestert, je höher seine Konzentration im Plasma ist.

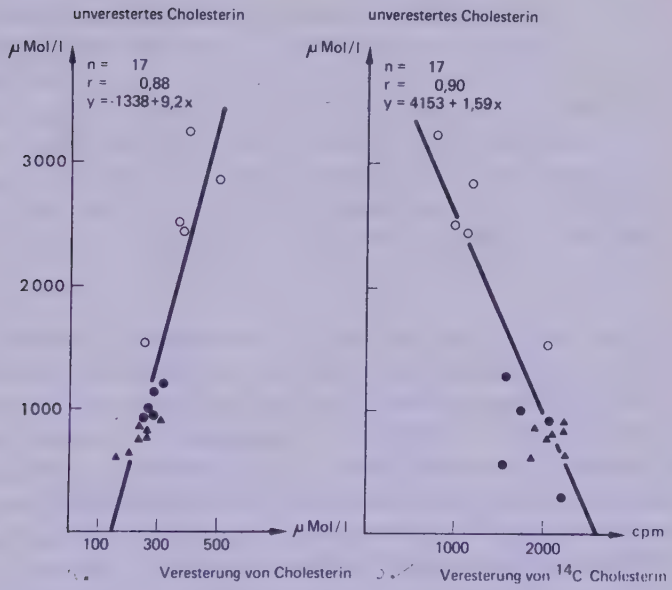
In Abbildung 7a wird die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substratkonzentration verdeutlicht. Die negative Korrelation ($p < 0{,}001$) zwischen der Konzentration des freien Cholesterins und der ^{14}C-Cholesterinveresterung ist auf den Verdünnungseffekt des endogenen freien Cholesterins auf das zugefügte ^{14}C-Cholesterin zurückzuführen (Abb. 7b). Je mehr freies endogenes Cholesterin vorhanden ist, umso weniger freies ^{14}C-Cholesterin kann verestert werden.

Abb. 7a,b: Korrelation zwischen der Konzentration des unveresterten Cholesterins und der Cholesterinveresterung (a), sowie zwischen der Konzentration des unveresterten Cholesterins und der ^{14}C-Cholesterinveresterung (b) nach 23-stündiger Inkubation bei 37° C. Berücksichtigt wurden alle drei untersuchten Kollektive. Die Cholesterinveresterung in Abb. 7a ist in µMol/ l und die ^{14}C-Cholesterinveresterung in Abb. 7b in CPM angegeben.

● = Normalpersonen,

▲ = Patienten mit Hyperthyreose,

o = Patienten mit Hypothyreose.



Um den Einfluß unterschiedlicher Substratkonzentrationen auszuschalten, der es verhindern könnte, möglicherweise vorhandene Unterschiede in der LCAT-Konzentration im Plasma von Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen

und Normalpersonen zu erfassen, wurde im folgenden ein Testsystem mit konstanten Substratmengen gewählt:

C. Cholesterinveresterung im Plasma von gesunden Personen und Patienten mit Hyperthyreose, Hypothyreose und Leberzirrhose bei konstanter Lipoproteinkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Meth. 6c)

Aus Plasma wurden die Lipoproteine durch Ultrazentrifugation bei erhöhter Dichte entfernt und durch ein Lipoproteinpräparat ersetzt, das in der Elektrophorese eine starke Anreicherung der α- und der ß-Lipoproteine zeigte (Meth. 8). Nach Zugabe von ^{14}C-Cholesterin enthielt das als Substratfraktion verwendete Lipoproteinpräparat in 1 ml 800 µg freies Cholesterin, 2135 µg Lecithin und 3,3 µg freies ^{14}C-Cholesterin (Meth. 5). Die Enzymfraktion, das lipoproteinfreie Patientenplasma (Meth. 6c), enthielt in 1 ml weniger als 30 µg freies Cholesterin und weniger als 40 µg Lecithin (Meth. 5). Ihre Proteinkonzentration betrug durchschnittlich 80 mg/ml (Meth. 7). In der Elektrophorese (Meth. 8) ließen sich Lipoproteine nicht mehr nachweisen.

Nach der Inkubation der Ansätze wurde die Cholesterinveresterung bestimmt. Sie war bei Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen von der des Normalkollektivs nicht signifikant verschieden. Dagegen war sie bei den Patienten mit Leberzirrhose hochsignifikant erniedrigt. Dasselbe war der Fall, wenn man der Enzymfraktion von Normalpersonen vor der Inkubation den SH-Gruppenblocker p-Hydroxymercuribenzoat in einer Konzentration von 2 mMol/l zusetzte. Diese Hemmung konnte durch Mercaptoäthanol weitgehend aufgehoben werden (5 µl Mercaptoäthanol/Ansatz) (Tab. 7, Abb. 8).

Tab. 7a-f: Veresterung von ^{14}C-Cholesterin und Cholesterin in Ansätzen mit konstanter Lipoproteinkonzentration während einer 23-stündigen Inkubation. Untersucht wurden Normalpersonen und Patienten mit Hyper- und Hypothyreose sowie mit Leberzirrhose. Bei 2 Normalpersonen wurde mit p-Hydroxymercuribenzoat eine Enzymhemmung herbeigeführt, die durch Zugabe von Mercaptoäthanol weitgehend aufhebbar war.
Die Cholesterinveresterung wurde in CPM, µMol/l und in Prozent der Ausgangskonzentration des freien Cholesterins im Ansatz angegeben. Die CPM sind auf 0,1 ml Lipidextrakt, der vor der Inkubation ein Äquivalent von 9987 ± 214 CPM freies ^{14}C-Cholesterin enthielt, zu beziehen. Die Konzentration des freien Cholesterins betrug in allen Ansätzen etwa 140 µg/ml (= 389 µMol/l) (Mittelwerte ± Standardabweichungen).

a. Normalkollektiv:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
H.K.	651,5	25,4	6,52
U.D.	1196,3	46,6	11,98
K.G.	1150,6	44,8	11,52
W.H.	852,1	33,2	8,53
K.P.	525,8	20,5	5,26
A.O.	931,9	36,3	9,33
J.B.	425,3	16,6	4,26
U.A.	528,6	20,6	5,29
R.K.	881,9	34,3	8,83
U.R.	809,6	31,5	8,11
D.B.	986,0	38,4	9,87
H.L.	856,9	33,4	8,58
H.S.	714,1	27,8	7,15
A.S.	640,0	24,9	6,41
L.U.	572,0	22,3	5,73
m±s	781,5 ±229,1	30,4 ±8,9	7,82 ±2,30

b. Hyperthyreosen:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
H.S.	719,0	28,0	7,20
C.K.	589,0	23,0	5,90
A.S.	813,0	31,7	8,14
D.K.	706,0	27,5	7,07
K.W.	704,5	27,4	7,05
m±s	706,3 ±79,5	27,5 ±3,1	7,07 ±0,80

c. Hypothyreosen:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
E.B.	599,0	23,3	6,00
E.L.	734,0	28,6	7,35
[illegible].G.	528,0	20,6	5,29
[illegible].S.	864,6	33,7	8,66
E.V.	513,0	20,0	5,14
m±s	647,7 ±149,4	25,2 ±5,8	6,49 ±1,50

d. Leberzirrhosen:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
H.E.	74,5	2,9	0,75
E.S.	66,8	2,6	0,67
G.G.	85,2	3,3	0,85
W.S.	84,7	3,3	0,85
E.G.	84,0	3,3	0,84
W.D.	173,3	6,8	1,74
T.H.	105,2	4,1	1,05
I.M.	84,2	3,3	0,84
H.G.	53,6	2,1	0,54
E.S.	198,2	7,7	1,98
$m \pm s$	101,0 ±47,0	3,9 ±1,8	1,01 ±0,47

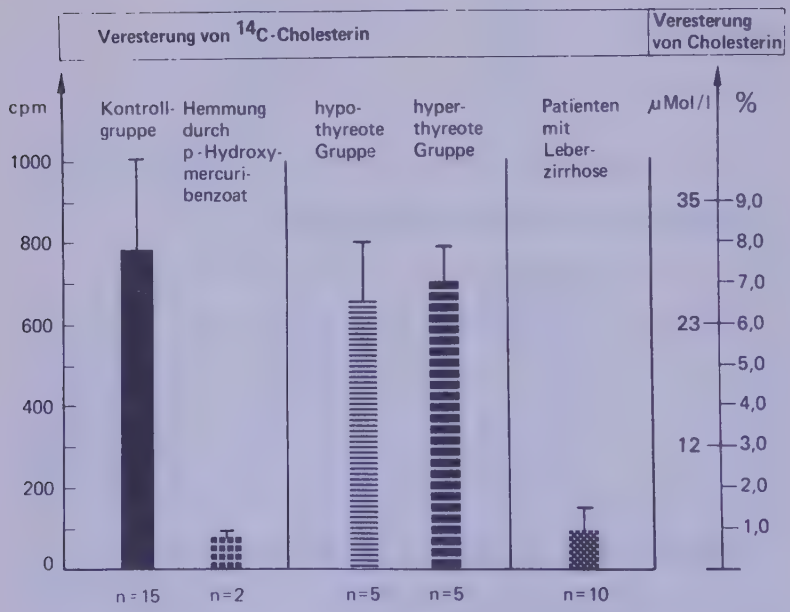
e. Hemmung mit p-Hydroxymercuribenzoat:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
M.R.	84,0	3,3	0,84
H.M.	76,0	3,0	0,76
m	80,0	3,15	0,80

f. Aufhebung der Hemmung durch Mercaptoäthanol:

Patient	Veresterung von ^{14}C-Cholesterin CPM	Cholesterin µMol/l	%
M.R.	521,0	20,3	5,22
H.M.	489,0	19,0	4,90
m	505,0	19,7	5,06

Abb. 8: Veresterung von ^{14}C-Cholesterin und Cholesterin in Ansätzen mit konstanter Lipoproteinkonzentration während einer 23-stündigen Inkubation. Untersucht wurden ein Normalkollektiv und Patienten mit Hyper- und Hypothyreose sowie mit Leberzirrhose. Eine bei 2 Normalpersonen durch p-Hydroxymercuribenzoat gehemmte Cholesterinveresterung ist zum Vergleich zusätzlich aufgeführt.
Die Cholesterinveresterung ist in CPM, µMol/l und in Prozent der Ausgangskonzentration des freien Cholesterins angegeben. Die CPM sind auf 0,1 ml Lipidextrakt, der vor der Inkubation ein Äquivalent von 9987 ± 214 CPM freies ^{14}C-Cholesterin enthielt, zu beziehen.



Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Befunde ist festzustellen, daß der Funktionszustand der Schilddrüse offenbar keinen unmittelbaren Einfluß auf die Aktivität der LCAT in Humanplasma hat. Es ist anzunehmen, daß die LCAT-Reaktion lediglich durch die in Zusammenhang mit dem Schilddrüsenfunktionszustand stehende Plasmalipidkonzentration verändert wird.
Nur so ist zu erklären, daß der Lecithinabbau und die Cholesterinveresterung bei hypothyreoten Patienten erheblich stärker ist als bei hyperthyreoten und Normalpersonen, während die Cholesterinveresterung unter Berücksichtigung konstanter Substratkonzentrationen in den drei Kollektiven nicht signifikant verschieden ist.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen des Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Systems führen zu dem Ergebnis, daß bei ungestörter Leberfunktion die Substratkonzentration einen entscheidenden Faktor bei der Cholesterinveresterung in menschlichem Plasma darstellt. Hohe Substratkonzentrationen, wie sie bei hypothyreoten Patienten vorkommen, gehen mit einem starken Lecithinabbau und einer starken Cholesterinveresterung und geringe Substratkonzentrationen mit einer herabgesetzten Lecithinhydrolyse und einer verminderten Cholesterinveresterung einher. Der Funktionszustand der Schilddrüse hat offenbar keinen Einfluß auf die Aktivität der LCAT, die bei Patienten mit einer Leberzellschädigung wie bei Leberzirrhose, offensichtlich wegen der damit verbundenen verminderten Syntheseleistung, herabgesetzt ist.
Die Bestimmung des Abbaus von Lecithin zu Lysolecithin und der Cholesterinveresterung, die bei hypothyreoten Patienten erheblich höher sind als bei Normalpersonen oder Patienten mit einer Hyperthyreose, lassen eine Aussage über die Aktivität des Enzym-Substrat-Komplexes zu. Eine Klärung, ob diese verstärkte Lecithinhydrolyse und Cholesterinveresterung lediglich eine Folge der erhöhten Substratkonzentration sind oder ob sie zusätzlich durch eine erhöhte LCAT-Aktivität bedingt sind, kann damit nicht erreicht werden.
Cooper und Gulbrandsen (51) sowie Wagner (52) fanden, daß durch Zugabe von Lecithin zu Plasma die LCAT-Reaktion in vitro stimuliert werden kann. Dieser Befund kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die zeigen, daß eine enge Korrelation zwischen der Lecithinkonzentration und dem Lecithinumsatz besteht, indirekt bestätigt werden. Wenn der Lecithinabbau zur Lecithinkonzentration im Plasma in Beziehung gesetzt wird, so fällt auf, daß er bei allen drei untersuchten Kollektiven mit 22 - 23 % etwa gleich groß ist. Wie der Lecithinabbau zeigt auch

die Lysolecithinzunahme eine deutliche Beziehung zur Lecithinkonzentration im Plasma. Sie liegt in ihrem Ausmaß deutlich unter der Konzentrationsabnahme des Lecithins. Eine Erklärung für diesen Befund könnte die von Dawson (13) beschriebene Lysolecithinase sein, die einen weiteren Abbau des Lysolecithins katalysiert. Auch Glomset et al. (22) sehen in diesem Enzym die Ursache für die Divergenz von molarem Lecithinabbau und molarer Lysolecithinentstehung. Trotz dieser Einschränkung führt die Bestimmung der Lysolecithinzunahme bei der Beurteilung des LCAT-Systems zu der gleichen Aussage wie die Bestimmung des Lecithinabbaus.
Auch die Cholesterinveresterung, die als Transacylierungsreaktion unmittelbar mit dem Umbau von Lecithin zu Lysolecithin in Verbindung steht, ist bei der Untersuchung des LCAT-Systems von Bedeutung. Bei der Verwendung der Isotopentechnik (Methoden 6b und c) basiert ihre Berechnung auf der Annahme, daß sich während der 23-stündigen Inkubationszeit ein Gleichgewicht zwischen dem freien endogenen Cholesterin und dem freien radioaktiven ^{14}C-Cholesterin einstellt. Wenn die Inkubationszeit weniger als 8 Stunden beträgt, ist die molare Veresterung von freiem Cholesterin kleiner als die Menge an Lecithin, die zu Lysolecithin abgebaut wird. Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein methodischer. Er dürfte darin bestehen, daß zum Erreichen eines vollständigen Gleichgewichtes zwischen dem markierten und dem endogenen freien Cholesterin ein Zeitraum von mehreren Stunden erforderlich ist. Stokke und Norum geben an, daß zur Äquilibrierung eine Mindestzeit von 4 Stunden benötigt wird (53). Nach 23-stündiger Inkubation entsprechen sich die Mengen an gebildetem Cholesterinester und abgebautem Lecithin, so daß Übereinstimmung mit den von Glomset (54) gefundenen Ergebnissen besteht. Wegen der langen Inkubationszeit von 23 Stunden erübrigt sich offenbar die von Stokke und Norum zur Äquilibrierung als erforderlich angesehene Präinkubation. Über die-

sen relativ langen Zeitraum wird die zunächst geringe Veresterungsrate des radioaktiven Substrates bei noch nicht eingestelltem Gleichgewicht ausgeglichen.
Die Abbauraten von Lecithin zu Lysolecithin zeigen, wie schon erwähnt wurde, bei den drei untersuchten Kollektiven eine deutliche Korrelation zur Lecithinkonzentration im Plasma. Offensichtlich scheint die LCAT-Reaktion wesentlich stärker von der Konzentration des Lecithins abhängig zu sein als von der des Cholesterins. Dafür spricht der Befund, daß der prozentuelle Lecithinabbau bei den hypothyreoten Patienten wesentlich stärker ist als die prozentuelle Cholesterinveresterung. Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen von Glomset (9), Wagner (52) sowie Cooper und Gulbrandsen (51) überein.
Eine von Monger und Nestel (55) beobachtete steigende Cholesterinveresterung bei Erhöhung der Konzentration an freiem Cholesterin könnte in Wirklichkeit auf eine gleichzeitige Erhöhung der Lecithinkonzentration zurückzuführen sein, die von den Autoren nicht untersucht worden ist.
Wie schon Calandra et al. (15) diskutierten, scheint der prozentuelle Substratumsatz nicht geeignet, genaueren Aufschluß über die Aktivität der LCAT zu geben, solange der Substratgehalt nicht konstant gehalten wird. Nur ein Versuchssystem mit weitgehend gleichbleibenden Substratkonzentrationen scheint geeignet, eine genauere Aussage über die enzymatische Aktivität zu liefern. Diese Bedingungen sind erfüllt, wenn die Lipoproteine durch Flotation bei erhöhter Dichte aus dem Plasma entfernt und durch ein genormtes Lipoproteinpräparat ersetzt werden. Sicherlich tritt bei der Ultrazentrifugation ein Verlust an enzymatischer Aktivität ein; da jedoch dieser Verlust bei sonst konstanten Bedingungen in allen Enzymfraktionen prozentuell etwa gleich hoch sein dürfte, ist die Voraussetzung zur Beurteilung der LCAT-Aktivität gegeben. Die Ergebnisse, die mit dieser Versuchsanordnung erzielt wurden, zeigen bei den Normal-

personen und den Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen eine weitgehend gleiche Veresterung. Erwartungsgemäß ist die enzymatische Aktivität bei Patienten mit Leberzirrhose und nach Zugabe von p-Hydroxymercuribenzoat zu Plasma von Normalpersonen erniedrigt. Eine derartig herabgesetzte Aktivität des Enzyms wurde bei keiner der untersuchten Normalpersonen und keinem der Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen gefunden.

Die vorläufigen Ergebnisse von Glomset (54), der eine erniedrigte Cholesterinveresterung bei Patienten mit Hypothyreose und begleitender Hypercholesterinämie fand, können in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der Wichtigkeit der Substratkonzentration für die Umsatzrate bei der LCAT-Reaktion erscheinen auch die Ergebnisse von Portman et al. (56) fraglich, die eine erhöhte LCAT-Aktivität bei Affen mit Arteriosklerose und Hypercholesterinämie fanden. Hier handelt es sich wahrscheinlich ebenfalls um eine substratbedingte Beeinflussung der LCAT-Reaktion.

Zusammenfassung:

Die Aktivität des Plasma-Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Systems wurde bei 5 Normalpersonen, 7 hyperthyreoten und 5 hypothyreoten Patienten untersucht. Dazu wurde die Abnahme der Lecithin- und die Zunahme der Lysolecithinkonzentration sowie die Veresterung des Cholesterins im Plasma während einer mehrstündigen Inkubationszeit bestimmt.
Die absolute Abnahme von Lecithin, die Zunahme von Lysolecithin und die Cholesterinveresterung waren bei den hypothyreoten Patienten höher als in den beiden anderen Kollektiven. Dagegen war die prozentuelle Abnahme der Lecithinkonzentration im Plasma aller 3 Kollektive gleich. Um eine Beeinflussung der Umsatzrate durch unterschiedliche Substratkonzentrationen auszuschließen, wurde ein Versuchssystem gewählt, in dem konstante Substratmengen mit einer enzymhaltigen, weitgehend substratfreien Plasmafraktion inkubiert wurden. Unter dieser Voraussetzung war die Veresterung bei den 3 untersuchten Kollektiven nicht signifikant verschieden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität der LCAT im Plasma von Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen im Vergleich zu normalen Individuen nicht verändert ist. Der verstärkte Lecithinabbau und die verstärkte Cholesterinveresterung bei den hypothyreoten Patienten sind folglich auf eine erhöhte Substratkonzentration zurückzuführen.
Im Gegensatz zu Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen war die LCAT-Aktivität bei Patienten mit Leberzirrhose deutlich geringer, was als Folge der verminderten LCAT-Synthese in der Leber anzusehen ist.

Literaturverzeichnis

(1) Gildea, E.F., Man, E.B., Peters, J.P.: J. Clin. Invest. 18, 739 (1939)

(2) Man, E.B., Gildea, E.F., Peters, J.P.: J. Clin. Invest. 19, 43 (1940)

(3) Peters, J.B., Man, E.B.: J. Clin. Invest. 22, 715 (1943)

(4) Kirkeby, K.: Acta endocrinol. 71, 62 (1972)

(5) Roseman, R.H., Byers, S.O.: J. Clin. Endocr. 12, 1287 (1952)

(6) Gries, F.A., Matschinsky, F., Wieland, O.: Biochim. biophys. Acta 56, 615 (1962)

(7) Tata, J.R., in Actions of Hormones on Molecular Progresses ed. by Litwack, G. and Kritchewsky, D., New York, Wiley 1964, pp. 58-131

(8) Sokoloff, L., Roberts, P.A., Januschka, M.M., Kline, J.E.: Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 652 (1968)

(9) Glomset, J.A.: J. Lipid Research 9, 155 (1968)

(10) Shah, S.N., Lossow, W.J., Chaikoff, I.L.: Biochim. biophys. Acta 84, 176 (1964)

(11) Goodman, D.S.: J. Clin. Invest. 43, 2026 (1964)

(12) Portman, O.W., Sugano, M.: Arch. Biochem. Biophys. 105, 532 (1964)

(13) Dawson, M.C.: Biochem. J. 64, 192 (1956)

(14) Gjone, E., Blomhoff, J.P., Wiencke: Scand. J. Gastroent. 6, 161 (1971)

(15) Calandra, S., Martin, M.I., Mc.Intyre, N.: Europ. J. Chim. Invest. 1, 352 (1971)

(16) Wengeler, H., Greten, H ., Seidel, D.: Europ. J. Clin. Invest. 2, 372 (1972)

(17) Kattermann, R., Wolfrum, D.J.: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 413 (1970)

(18) Sugano, M., Hori, K., Nada, M.: Arch. of Bioch. and Bioph. 129, 588 (1969)

(19) Brot, N., Lossow, W.I., Chaikoff, I.L.: J. Lipid. Res. 3, 413 (1962)

(20) Fex, G., Wallinder, L.: Biochim. Biophys. Acta 210, 109 (1970)

(21) Simon, I.B., Boyer, I.L.: Biochim. Biophys. Acta 218, 549 (1971)

(22) Glomset, J.A., Parker, F., Tjaden, M., Williams, R.H .: Biochim. Biophys. Acta 58, 398 (1962)

(23) Glomset, J.A., Wright, J.: Biochim. Biophys. Acta 89, 266 (1964)

(24) Glomset, J.A., Janssen, E., Kennedy, R., Dobbins, J.: J. Lipid. Research 7, 638 (1966)

(25) Lossow, J., Shah, S.N., Chaikoff, I.L.: Biochim. Biophys. Acta 116, 172 (1966)

(26) De Lalla, O.F., Gofman, I.W.: Meth. biochem. Analysis 1, 459 (1954)

(27) Korn, E.D.: Meth. biochem. Analysis 7, 145 (1959)

(28) Kayser, F.H., Nass, G., Ruhenstroth-Bauer, G.: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem. 331, 95 (1963)

(29) Adlkofer, F., Schiebel, W., Ancker, E., Ruhenstroth-Bauer, G.: Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. Physiol. Chem. 349, 417 (1968)

(30) Norum, K.R., Gjone, E.: Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 20, 231 (1967)

(31) Norum, K.R., Gjone, E.: Acta med. scand. 183, 107 (1968)

(32) Sperry, W.M.: J. Biol. Chem. 111, 467 (1935)

(33) Watson, D.: Clin. Chim. Acta 5, 637 (1960)

(34) Zöllner, N.: Dtsch. med. Wschr. 84, 386 (1961)

(35) Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A.J.: J. Lab. Clin. Med. 41, 486 (1953)

(36) Leffler, H.H .: Amer. J. clin. Path. 24, 1307 (1954)

(37) Zak, B. et al.: Amer. J. clin. Path. 31, 310 (1959)

(38) Zilversmit, D.B., Davis, A.R.: J. Lab. Clin. Med. 35, 155 (1950)

(39) Eggstein, M., Kreutz, F.H.: Klin. Wschr. 44, 262 (1966)

(40) Schmidt, F.H. et al.: Z. klin. Chem. 6, 156 (1968)

(41) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.: J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)

(42) Haberman, E., Bandtlow, G., Krusche, B.: Klin. Wschr. 39, 816 (1961)

(43) Adlkofer, F., Förg, W., Abrar, B., Armbrecht, U.: Verhandl. der Dt. Gesellschaft f. Inn. Med. 79, 1273 (1973)

(44) Zahler, P.: Z . klin. Chem. u. klin. Biochem. 4, 191 (1967)

(45) Fiske, C., Subbarow, Y.: J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)

(46) Bartlett, G.R.: J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)

(47) Porte, D., Havel, R.J.: J. Lipid. Research 2, 357 (1961)

(48) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.I., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

(49) Klemens, U.H ., Schmalbeck, J.: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, 540 (1969)

(50) Fredrickson, D.S., Levy, R.J., Lees, R.S.: New Engl. J. Med. 276, 34, 94, 148, 215, 273 (1967)

(51) Cooper, R.A., Gulbrandsen, C.L.: J. Lab. Clin. Med. 78, 323 (1971)

(52) Wagner, A.: Circulation Res. 3, 165 (1955)

(53) Stokke, K.T., Norum, K.R.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 27, 21 (1971)

(54) Glomset, J.A.: Biochim. Biophys. Acta 65, 128 (1962)

(55) Monger, E.A., Nestel, P.J.: Clin. Chim. Acta 15, 269 (1967)

(56) Portman, O.W., Soltys, P., Alexander, M., Osuga, T.: J. Lipid. Research 11, 596 (1970)

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1970 bis Oktober 1973 in der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Priv. Doz. Dr. Adlkofer und Herrn Prof. Dr. Schleusener danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 28. August 1945 wurde ich in Magdeburg als Sohn des Kaufmannes Fritz Armbrecht und seiner Ehefrau Gertrud geboren.
1951 verzogen meine Eltern mit mir in die Bundesrepublik nach Bremen. Dort verbrachte ich meine Schulzeit und bestand im Jahre 1965 das Abitur. Anschließend begann ich eine zweieinhalbjährige Banklehre, die ich im Herbst 1967 mit der Kaufmannsgehilfenprüfung beendete.
Vom WS 1967/68 bis zum SS 1973 studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Mein Staatsexamen legte ich im Februar 1974 ab.
Den internen Abschnitt meiner Medizinalassistentenzeit habe ich im Klinikum Steglitz beendet. Zur Zeit arbeite ich auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Gaildorf/Württ.
Mit der vorliegenden Arbeit habe ich mich seit August 1970 beschäftigt.